

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-271330

(P2004-271330A)

(43) 公開日 平成16年9月30日 (2004. 9. 30)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード (参考)

GO 1 N 27/30

GO 1 N 27/30

A

2 GO 4 5

GO 1 N 27/416

GO 1 N 27/30

F

GO 1 N 33/483

GO 1 N 33/483

F

// GO 1 N 33/15

GO 1 N 27/46

3 8 6 Z

GO 1 N 33/50

GO 1 N 33/15

Z

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-62228 (P2003-62228)

(22) 出願日 平成15年3月7日 (2003. 3. 7)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(74) 代理人 100097445

弁理士 岩橋 文雄

(74) 代理人 100103355

弁理士 坂口 智康

(74) 代理人 100109667

弁理士 内藤 浩樹

(72) 発明者 中谷 将也

大阪府門真市大字門真1006番地 松下

電子部品株式会社内

(72) 発明者 岡 弘章

大阪府門真市大字門真1006番地 松下

電子部品株式会社内

最終頁に続く

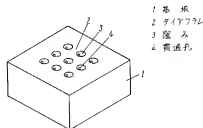
(54) 【発明の名称】 細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法

## (57) 【要約】

【課題】従来の細胞外電位測定デバイスでは被験体細胞を保持する窪み内に、被験体細胞が確実に固定されているかどうかを容易に判断することが困難であった。

【解決手段】基板1の一面側にダイアフラム2を設け、このダイアフラム2を構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪み3を設け、この窪み3の最深部より上部に貫通孔4を設け、この貫通孔4の前記窪み3と反対側の開口部に検出電極5を設けることにより、貫通孔4内の培養液のイオン濃度を効率よく測定することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深部より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 2】

貫通孔を少なくとも 2 つ以上設けた請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 3】

貫通孔にそれぞれの検出電極を設けた請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 4】

基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深部より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に少なくとも 2 つ以上の検出電極を設けた細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 5】

基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みに矩形もしくは U 字形あるいはこれらを組み合わせてなる形状の貫通孔を前記窪みの最深部より上部に設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 6】

基板がシリコンである請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 7】

基板が SOI 基板である請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 8】

窪みの開口部の寸法が  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  であり、貫通孔の最小開口径もしくは幅が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$  である請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 9】

貫通孔の形状が矩形あるいは U 字形もしくはこれらの組み合わせである請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 10】

基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深部より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、基板の他面側からエッチングによって前記ダイアフラムを形成する工程と、このダイアフラムを構成するいずれかの面のの上に 1 枚のフォトマスクを用いてレジストマスクを形成する工程と、ドライエッチングによって前記窪み、前記貫通孔の順に形成する工程と、この貫通孔の窪みとは反対側の開口部に薄膜形成技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法。

## 【請求項 11】

窪みを形成する際にはエッチングを促進するガスのみを用い、次に貫通孔を形成する際にはエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いて形成する請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

## 【請求項 12】

少なくとも 2 回以上基板を異なる方向に傾け、それぞれにエッチングを行うことにより窪みの中に複数の貫通孔を形成する請求項 11 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

## 【請求項 13】

レジストマスクのエッチングホールの形状は所望とする貫通孔の形状とほぼ同じになるように形成する請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

## 【請求項 14】

10

20

30

40

50

プラズマ中のイオンの進行方向と基板の角度を89度以下に傾けてエッチングすることにより貫通孔を形成する請求項13に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項15】

基板がシリコンよりなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、エッチングを促進するガスが $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つを含むガスを用い、エッチングを抑制するガスが $\text{C}_4\text{F}_8$ 、 $\text{CHF}_3$ のいずれかまたはこれらを含むガスを用いる請求項11に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞外電位あるいは細胞の活動に発生する物理化学的变化を測定するために用いられる細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法であり、例えば化学物質によって細胞が発する反応を検出する薬品スクリーニングに用いられる。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の電氣的活動を指標にして薬品をスクリーニングすることはパッチクランプ法、蛍光色素または発光指示薬を用いる方法により行われている。

【0003】

このパッチクランプ法はマイクロピペットの先端部分に付けた細胞膜の微小部分（パッチと呼ぶ）を用いて、単一のチャネルタンパク質分子を介するイオンの輸送を微小電極プローブによって電氣的に記録する方法であり、この方法は一個のタンパク質分子の機能をリアルタイムで調べることのできる数少ない方法の一つである（例えば、非特許文献1参照）。

【0004】

また、特定のイオンの濃度変化に応じて光を発する蛍光色素または発光指示薬により、細胞内のイオンの移動をモニタすることで細胞の電氣的活動を測定する方法もある。

【0005】

しかし、パッチクランプ法はマイクロピペットの作成および操作に特殊な技術を必要とし、一つの試料の測定に多くの時間を要することから大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする用途には適していない。

【0006】

また、蛍光色素などを利用する方法は大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングすることができる。しかしながら細胞を染色する工程が必要になるとともに、用いる色素の影響により測定時に検出されるバックグラウンド・レベルが高くなってしまったり、時間とともにこの色素が脱色するためにS/N比が悪くなるという欠点がある。

【0007】

これに代わる方法として、細胞の保持手段を有した基板およびこれに設けられた電極によって細胞外電位を測定するデバイスも発明者らのグループにより提案されている（例えば、特許文献1参照）。この方法はパッチクランプ法で得られるデータと同等の高品質なデータが得られ、しかも蛍光色素を用いる方法のように簡易に高速で大量の試料を測定できるものであり、基板上に設けられた細胞の保持手段を有する少なくとも一つのウエルと、このウエルに電気信号を検出するセンサー手段とを有する細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定するものである。

【0008】

上記特許文献1で開示される細胞外電位測定デバイスの動作について図面を用いて詳細に説明する。

【0009】

図24は上記特許文献1で開示される細胞外電位測定デバイスのウエル構造を模式断面図で示したものであり、ウエル40内に培養液48が入れられ、被験体細胞47は基板42に設けられた細胞保持手段によって捕捉または保持されている。細胞保持手段は基板42

に形成された窪み 4 1 および開口部を介して、この窪み 4 1 に連絡する貫通孔 4 4 を備えた構成となっている。

【0010】

さらに、貫通孔 4 4 の中にはセンサー手段である測定電極 4 5 が配置されており、この測定電極 4 5 は配線を経て信号検出部に連結されている。

【0011】

そして、測定の際には被験体細胞 4 7 を貫通孔 4 4 側から吸引ポンプなどの手段により、この被験体細胞 4 7 が窪み 4 1 部分に密着保持される。このようにして被験体細胞 4 7 の活動により発生する電気信号はウエル 4 0 中の培養液 4 8 側に漏れることなく、貫通孔 4 4 側に設けた測定電極 4 5 によって検出される。

【0012】

ここで、被験体細胞 4 7 を保持する窪み 4 1 の大きさは  $10 \sim 30 \mu\text{m}$  程度であり、貫通孔 4 4 側の大きさが  $1 \sim 5 \mu\text{m}$  と 2 段階にする必要がある。この形状を正確に実現するためには 2 種類のマスクを用いる必要があり、第一のマスクによりドライエッチングを行って窪み 4 1 を形成した後、第二のマスクによってドライエッチングを行って貫通孔 4 4 を形成する必要がある。

【0013】

【非特許文献 1】

「細胞の分子生物学、第三版」、Garland Publishing Inc.、New York、1994、日本語版、中村桂子ら監訳、181～182 頁、1995 年、教育社

【特許文献 1】

W002/055653 号公報

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記のような細胞外電位測定デバイスにおいて特に問題となるのは、被験体細胞 4 7 が窪み 4 1 の中に保持された場合でも、貫通孔 4 4 が窪み 4 1 の最深部に形成されていることから、窪み 4 1 の中間部に細胞膜が密着してしまうと貫通孔 4 4 は上部のウエル 4 0 の培養液 4 8 と電気的に導通してしまい、精度の高い測定ができないという問題があった。

【0015】

さらに、被験体細胞 4 7 が窪み 4 1 の中に保持され、さらに貫通孔 4 4 を覆うように細胞膜が密着しているかどうかを調べる手段がなかった。

【0016】

また、前述のように 2 種類のマスクを用いて行くと、第一のマスクによるドライエッチングを行った後第二のマスクを用いてドライエッチングを行う際にマスクのアライメントずれが生じ、さらに 2 枚のマスクを用意してフォトリソグラフィをそれぞれ別々に行うことから製造的にも手間がかかり、コスト高を招くことがあった。

【0017】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項 1 に記載の発明は、基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深部より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイスであり、この貫通孔が窪みの最深部より上部に設けられていることから培養液と被験体細胞をダイアフラムの窪みが形成されている側より投入したとき、被験体細胞は窪み内に保持されるが、この被験体細胞が窪み内の最深部に到達しなくても、より確実に貫通孔を被験体細胞の細胞膜が隙間無く密着することができるので、貫通孔内の培養液とダイアフラムの上面側の培養液は遮断され、細胞が活動する際に発する物理化学的变化を貫通孔側に設けられた検出電極によって効率よく検出することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

## 【0018】

本発明の請求項2に記載の発明は、貫通孔を少なくとも2つ以上設けた請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、被験体細胞が窪み内側にある複数の貫通孔のうち、いずれかを細胞膜によって覆うと、その貫通孔からの信号によって細胞外電位を測定することができるので、より確実に測定ができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。さらに同じ窪み内に2つ以上の貫通孔が設けられているので、貫通孔間の抵抗値を測定することで被験体細胞が貫通孔を覆っているかどうかを判断することができる。つまり、細胞膜がいずれの貫通孔も覆っていない場合は培養液によって貫通孔どうしは導通しているため抵抗値は低い、いずれかあるいは両方の貫通孔が細胞膜によって覆われている場合には貫通孔どうしの抵抗値は大きなものとなる。これによって、被験体細胞の保持時に貫通孔を確実に細胞膜が覆っているかどうかを判断することができる。

10

## 【0019】

本発明の請求項3に記載の発明は、貫通孔にそれぞれの検出電極を設けた請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、それぞれの貫通孔に検出電極が設けられているので同じ貫通孔に複数の検出電極が設けられていることになり、この検出電極間の抵抗値を測定することで、貫通孔内の培養液のイオン濃度変化を測定することができるようになる。

## 【0020】

さらに、貫通孔が複数に分かれていることから検出電極を設けやすいという製造上の利点も有する。

## 【0021】

本発明の請求項4に記載の発明は、基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深处より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に少なくとも2つ以上の検出電極を設けた細胞外電位測定デバイスであり、この検出電極間の抵抗値を測定することにより貫通孔内の培養液のイオン濃度変化を測定することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

20

## 【0022】

本発明の請求項5に記載の発明は、基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みもしくはU字形あるいはこれらを組み合わせる形状の貫通孔を前記窪みの最深处より上部に設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイスであり、円形状の貫通孔に比べてその直径サイズよりも狭い幅の貫通孔とすることができることから、被験体細胞が貫通孔内に不用意に引き込まれることなく窪み内にどまりながら貫通孔を細胞膜が覆うことができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

30

## 【0023】

また、被験体細胞の形状が楕円球状に変形しやすい場合は貫通孔を矩形にすることで窪みの形状を楕円球状にすることができる。

## 【0024】

さらに、矩形の長さは円形状の貫通孔の直径サイズより長くなるので、同一の貫通孔に2つ以上の検出電極を形成することが容易であるという製造上の利点も有する。

40

## 【0025】

さらに、貫通孔がU字形の場合には外形が丸まっていることから、窪みをより球形にした場合に容易に実現できるという製造上の利点を有する。つまり、矩形の場合は矩形の貫通孔を中心とする窪みは楕円球形状になるが、U字形の場合は貫通孔の開口部を中心に集めることができるので、窪みがより球形に近い形になるのである。

## 【0026】

本発明の請求項6に記載の発明は、基板がシリコンである請求項1～5のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイスであり、ダイアフラム、窪み、貫通孔をドライエッチングにより高精度に形成した細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

50

## 【0027】

本発明の請求項7に記載の発明は、基板がSOI基板である請求項1～5のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイスであり、より高精度で生産性に優れた細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

## 【0028】

本発明の請求項8に記載の発明は、窪みの開口部の寸法が $10 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、貫通孔の最小開口径もしくは幅が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ である請求項1～5のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイスであり、このような形状は数～数十 $\mu\text{m}$ の被験体細胞を効率的に窪みに保持することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

## 【0029】

本発明の請求項9に記載の発明は、貫通孔の形状が矩形あるいはU字形もしくはこれらの組み合わせである請求項1～5のいずれか一つに記載の細胞外電位測定デバイスであり、貫通孔が矩形となることで、円形状に比べて狭い幅の貫通孔とすることができる。このことにより、被験体細胞が貫通孔内に不用意に引き込まれることなく、窪みの内にとどまりながら貫通孔を細胞膜が覆うことができるようになることから測定が確実にできる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

## 【0030】

また、被験体細胞の形状が楕円球状に変形しやすい場合は、貫通孔を矩形にすることで窪みの形状を楕円球状に容易にすることができる。

## 【0031】

さらに、矩形の長さは円形の貫通孔に比べて長くなるので、同一の貫通孔に2つ以上の検出電極を形成することが容易であるという製造上の利点も有する。

## 【0032】

さらに、貫通孔がU字形の場合では、上記と同様の効果が得られる上、外形が丸くなっているために窪みをより球形にしたい場合において、容易に実現できるという製造上の利点を有する。つまり、矩形の場合は、矩形の貫通孔を中心とする窪みは楕円球形状になるが、U字の場合は貫通孔の開口部が中心に集めることができるので、窪みがより球に近い形になるのである。

## 【0033】

本発明の請求項10に記載の発明は、基板の一面側にダイアフラムを設け、このダイアフラムを構成するいずれかの面に少なくとも一つ以上の曲面からなる窪みを設け、この窪みの最深部より上部に貫通孔を設け、この貫通孔の前記窪みと反対側の開口部に検出電極を設けた細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、基板の他面側からエッチングによって前記ダイアフラムを形成する工程と、このダイアフラムを構成するいずれかの面の上に1枚のフォトリソマスクを用いてレジストマスクを形成する工程と、ドライエッチングによって前記窪み、貫通孔の順に形成する工程と、この貫通孔の窪みとは反対側の開口部に薄膜形成技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、1枚のフォトリソマスクによってレジストマスクを形成することができるので、窪み内の正確な位置に貫通孔を形成できるようになる細胞外電位測定デバイスの製造方法を提供することができる。

## 【0034】

本発明の請求項11に記載の発明は、窪みを形成する際にはエッチングを促進するガスのみを用い、次に貫通孔を形成する際にはエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いて形成する請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを促進するガスおよびエッチングを抑制するガスを用いることにより、窪みおよび貫通孔の形状を容易に形成できる。

## 【0035】

本発明の請求項12に記載の発明は、少なくとも2回以上基板を異なる方向に傾け、それぞれにエッチングを行うことにより窪みの中に複数の貫通孔を形成する請求項11に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、これにより貫通孔を窪み内に複数設けるこ

10

20

30

40

50

とができる細胞外電位測定デバイスの製造方法を提供することができる。

【0036】

本発明の請求項13に記載の発明は、レジストマスクのエッチングホールの形状は所望とする貫通孔の形状とほぼ同じになるように形成する請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、窪みおよび貫通孔の大きさは被検体細胞の大きさによって決められるものであるがフォトマスクで形成するエッチングホールは必要とする貫通孔の大きさにしておくことにより、窪みの大きさは貫通孔の大きさ以上であれば自由に決めることができるので、窪みおよび貫通孔の形状をより容易に形成することができる。

【0037】

本発明の請求項14に記載の発明は、プラズマ中のイオンの進行方向と基板の角度を89度以下に傾けてエッチングすることにより貫通孔を形成する請求項13に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、これにより窪みの最深部より上部に貫通孔を形成することができる。

10

【0038】

本発明の請求項15に記載の発明は、基板がシリコンよりなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、エッチングを促進するガスが $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちのいずれか一つを含むガスを用い、エッチングを抑制するガスが $\text{C}_4\text{F}_8$ 、 $\text{CHF}_3$ のいずれかまたはこれらを含むガスを用いる請求項11に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、所望とする形状を効率よく得ることができる。

【0039】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法について実施の形態および図面を用いて説明する。

20

【0040】

（実施の形態1）

本発明の実施の形態1および図1～図23により請求項1～14に記載の発明について説明する。

【0041】

図1は本発明の実施の形態1における細胞外電位測定デバイスを示す斜視図であり、図2はこれを上面から見た平面図であり、図3、図10は同断面図である。図4、図5、図11は貫通孔の周辺部の拡大図であり、図6～図9は本発明の細胞外電位測定デバイスの動作を説明するための要部拡大断面図である。また図12～図21は製造工程を説明するための断面図であり、図22、図23は他の細胞外電位測定デバイスの構成を示す斜視図である。

30

【0042】

次に、その構成を説明する。図1～図3において、基板1はシリコンで形成されており、基板1の一面側にはダイアフラム2が形成されている。このダイアフラム2の材質は基板1と同じシリコンであり、厚みは約 $25\mu\text{m}$ である。3は窪みであり半球形の曲面で構成されており、開口部の大きさは約 $20\mu\text{m}$ である。窪み3には貫通孔4がダイアフラム2を貫通するごとく形成されている。この貫通孔4は図3に示すように窪み3の最深部より上部に位置する箇所に設けられており、ダイアフラム2の厚み方向に対して約 $45^\circ$ 傾いている。なお、この貫通孔4は円もしくは楕円形状をしており、円または楕円の長径が約 $5\mu\text{m}$ である。さらに、ダイアフラム2の下面側において図4および図5の貫通孔4の周辺部の拡大図に示すように、図4では金を主体とする検出電極5が貫通孔4の開口部に近接して形成されており、図5では複数の検出電極5a、5bが貫通孔4の開口部に近接して形成されている。

40

【0043】

以下、図面を用いて本発明の細胞外電位測定デバイスの動作を説明する。

【0044】

まず、培養液の物理化学的变化を検出する手順に付いて説明する。図6、図7はダイアフ

50

ラム 2 において窪み 3、貫通孔 4、検出電極 5 a、5 b が形成された箇所の拡大断面図である。図 7 に示すように、ダイアフラム 2 の上部を培養液 6 で満たすと、窪み 3、貫通孔 4 は培養液 6 によって順に満たされる。そこで、ダイアフラム 2 の上部空間を加圧、もしくはダイアフラム 2 の下部空間を減圧にすると培養液 6 は貫通孔 4 から外方へ飛び出すが、加圧あるいは減圧を適度な値にすると貫通孔 4 の先端においては開口部より培養液 6 がメニスカス形状を形成して定常状態となる。

#### 【0045】

これにより、培養液 6 は検出電極 5 a および 5 b に安定的に接触することになる。検出電極 5 a と 5 b は図 5 でも明らかなように、電気的には絶縁された箇所に形成されている。しかし、培養液 6 が貫通孔 4 からメニスカス形状によって検出電極 5 a、5 b に接触することにより、電解質である培養液 6 を介して、両者の電気的接続が行われるのである。ここで検出電極 5 a、5 b 間の抵抗値は培養液 6 のイオン濃度と関係している。

10

#### 【0046】

つまり、培養液 6 のイオン濃度の変化は検出電極 5 a、5 b 間の抵抗値の変化によって検出することができるのである。さらに、この抵抗値を測定すれば培養液 6 が貫通孔 4 において適当なメニスカスを形成しているかどうか分かる。その理由はメニスカスが不十分であれば検出電極 5 a、5 b への接触も不十分となり、抵抗値が大きな値を示すからである。

#### 【0047】

次に、被験体細胞の細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する手順について説明する。

20

#### 【0048】

図 8 に示すように、被験体細胞 8 を培養液 6 と共に投入し、ダイアフラム 2 の上部空間を加圧もしくはダイアフラム 2 の下部空間を減圧すると、被験体細胞 8 および培養液 6 は共に窪み 3 内へ引き込まれる。さらに引き込みを続けると、ついには図 9 に示すように貫通孔 4 側へも引き込まれ、被験体細胞 8 の細胞膜は貫通孔 4 の開口部を塞ぐように吸着する。ここで、本実施の形態 1 では貫通孔 4 の開口部は窪み 3 内の最深部より上部に形成されているために被験体細胞 8 が窪み 3 の開口部より若干大きいような場合においても、窪み 3 および貫通孔 4 側に引き込まれる際、図 9 の A 部のように最深部に隙間ができるなど窪み 3 の最深部に到達しなくても、被験体細胞 8 が若干の変形を起こすだけで貫通孔 4 の開口部を塞ぐことができるようになる。つまり、より確実に被験体細胞 8 の窪み 3 内への保持を可能にすることができる。

30

#### 【0049】

ここで、窪み 3 は曲面で構成されているので、被験体細胞 8 を保持するためにより効率的な形状となっている。

#### 【0050】

さらに、被験体細胞 8 が窪み 3 内に保持された後に培養液 6 が貫通孔 4 の開口部で適当なメニスカスを形成するように上下の圧力を調整する。このときには前述のように検出電極 5 a、5 b 間の抵抗値を測定しながら圧力調整を行うことができる。

#### 【0051】

また、被験体細胞 8 を窪み 3 内で貫通孔 4 の開口部を塞ぐように保持した後は被験体細胞 8 への刺激となりうる行為を施す。この刺激の種類としては、例えば化学薬品、毒物などの化学的な刺激に加え、機械的変位、光、熱、電気、電磁波などの物理的な刺激などがあ

40

#### 【0052】

そして、前記被験体細胞 8 がこれらの刺激に対して活発に反応する場合、被験体細胞 8 は細胞膜が保有するイオンチャネルを通じて各種イオンを放出あるいは吸収する。この反応は被験体細胞 8 が培養液 6 と接している箇所において起こり、貫通孔 4 内の培養液 6 と被験体細胞 8 の間でもイオン交換が行われる。

#### 【0053】

50



この結果として、貫通孔 4 内の培養液 6 のイオン濃度は変化し、前述したように検出電極 5 a、5 b によってその変化を検出することができるようになる。

【0054】

なお、ここでは検出電極 5 a、5 b の 2 つの電極を形成したが、検出電極は一つでも測定は可能である。その方法は図 4 に示すように、ダイアフラム 2 の上部を満たす培養液 6 と同電位の参照電極（図示せず）と検出電極 5 との間の電圧を測定することで貫通孔 4 内のイオン濃度の変化を測定することができるので被験体細胞 8 の細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定することができる。

【0055】

なお、イオン濃度の変化は抵抗値だけではなく、電流値、電荷量、電位などの別の物理量を測定することでも測定可能である。

【0056】

また、貫通孔 4 は窪み 3 内の最深部より上部に設けられ、ダイアフラム 2 の厚み方向に対して 45° の角度で傾いている。これにより、本実施の形態 1 の応用として、図 10 に示すように貫通孔 10 a、10 b として窪み 3 内に複数個設けることが可能である。この場合は図 11 に示すように、金を主体とする検出電極 11 a、11 b をそれぞれの貫通孔 10 a、10 b に設けることによって、前記貫通孔が一つの場合と同様にダイアフラム 2 の上部を培養液 6 で満たすと、窪み 3、貫通孔 10 a、10 b が満たされ、上下の圧力差によって培養液 6 が貫通孔 10 a、10 b の先端でメニスカス形状を形成し、検出電極 11 a、11 b にそれぞれ接触する。こうして検出電極 11 a、11 b 間の抵抗値を測定することにより、貫通孔 10 a、10 b の先端で適当なメニスカスが形成されているかがわかり、貫通孔 10 a、10 b 内のイオン濃度の変化もわかる。

【0057】

そして、被験体細胞 8 を培養液 6 と共に投入した場合は貫通孔 10 a、10 b を被験体細胞 8 の細胞膜が覆うように保持されているかどうか判断できる。たとえば貫通孔 10 a のみを細胞膜が塞ぎ、貫通孔 10 b は塞がれていない場合は検出電極 11 a とダイアフラム 2 の上部の培養液 6 からとの参照電極（図示せず）間の抵抗値は高く、検出電極 11 b と参照電極間は低くなることで判断できる。

【0058】

なお、貫通孔 10 a、10 b は離れて形成されているので検出電極 11 a、11 b を容易に形成できるという製造上の利点も有する。

【0059】

上記の状態では被験体細胞 8 に外部より刺激を与えると被験体細胞 8 の活動が起こり、貫通孔 11 a、11 b 内のイオン濃度が変わるので被験体細胞 8 の細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化が測定できる。

【0060】

また、本実施の形態 1 では窪み 3 の最深部より上部に貫通孔 4、10 a、10 b を形成したが、図 21 に示すように貫通孔 14 を最深部に設けることは後述する製造方法によれば全く難しいことではない。この場合には、被験体細胞 8 が容易に最深部にまで到達できるように被験体細胞 8 に応じて適当な窪み 3 の大きさ、形状のものを選択する必要がある。

【0061】

次に、本実施の形態 1 では貫通孔 4、10 a、10 b の大きさは丸形状あるいは楕円形状としたが、矩形あるいは U 字形状とすることもできる。

【0062】

図 22、図 23 はそれぞれ貫通孔 15、17 を矩形、U 字形状にした細胞外電位測定デバイスの斜視図である。図 22 に示すように貫通孔 15 が矩形の場合は窪み 16 の形状はカマボコ状に丸みを持った形状となり、図 23 に示すように貫通孔 17 が U 字形状の場合には窪み 18 の形状はほぼ半球状になる。

【0063】

前記のような形状とすることで、窪み 16 がカマボコ状の場合には被験体細胞 8 の固定形

10

20

30

40

50

状が細長くなるような場合（例えば、モノアラガイ由来の神経節細胞）に最適であり、窪み 18 の形状を半球にして貫通孔 17 の形状を U 字形状にした場合には、例えば被験体細胞 8 が変形しやすく、丸形状にした貫通孔 4 では通り抜けてしまうような場合において有効である。つまり、貫通孔 17 を U 字にすると、貫通孔 17 内を満たす培養液 6 の容量をさほど減らすことなく開口部の最小幅部分を小さくできることから、不用意に被験体細胞 8 が貫通孔 17 内に入ると壊れることが少なくなる。

【0064】

なお、窪み 3、16、18、貫通孔 4、15、17 の大きさは測定する被験体細胞 8 の大きさ、形状、性質によって決められるものであるが、窪み 3、16、18 の大きさを  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  とし、貫通孔 4、15、17 の大きさを  $1 \sim 10 \mu\text{m}$  にすることによって  $5 \sim 100 \mu\text{m}$  程度の大きさの被験体細胞 8 を測定することができる。

10

【0065】

次に本発明の細胞外電位測定デバイスの製造方法について図 12～図 21 を用いて説明する。

【0066】

図 12～図 21 は本実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図である。

【0067】

この細胞外電位測定デバイスの製造方法は図 12 に示すようにシリコンからなる基板 1 を用意し、基板 1 の他面にレジストマスク 12 を形成した後、図 13 のように下面から所定の深さだけエッチングすることによって、上部にダイアフラム 2 を形成する。

20

【0068】

そして、エッチングした後、前記レジストマスク 12 は除去する。

【0069】

次に、図 14 に示すようにダイアフラム 2 の外表面にレジストマスク 13 を形成する。このときのレジストマスク 13 のエッチングホールは形状は必要とする貫通孔 4 の形状とほぼ同じになるよう設計しておく。

【0070】

その後、図 15 に示すようにドライエッチングによってダイアフラム 2 側からエッチングを行う。このとき、エッチングガスとしてはエッチングを促進するガスのみを用いる。

30

【0071】

基板 1 がシリコンの場合、このエッチングを促進するガスには  $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$  などを用いることができる。これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけでなく、横方向へのエッチングも促進する作用があるからである。実験では  $\text{XeF}_2$  を用いて効果を確認している。これによって、エッチング形状は図 15 に示すように開口部を中心とする半球形となり、窪み 3 が形成される。またレジストマスク 13 はほとんどエッチングされないで、図 15 のように最初の形状を保っている。

【0072】

次に、図 16 に示すように基板 1 をイオンの進行方向に対して  $45^\circ$  傾けて、ドライエッチングを行う。このときのエッチングガスとしてはエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを交互に用いる。エッチングを促進するガスとしては  $\text{XeF}_2$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{SF}_6$  などがある。またエッチングを抑制するガスとしては  $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$  などがある。これらのガスを混合してエッチングすることで、エッチングされた壁面に  $\text{CF}_2$  のポリマーである保護膜を形成するので、ドライエッチングによる貫通孔 4 の形成をレジストマスク 13 の下方のみに進行させることが可能となる。

40

【0073】

ここで、エッチングが下方のみに進行する仕組みを少し詳しく説明する。

【0074】

まず、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッ

50

チング形状とすることができる。この工程ではエッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、外部コイルによる誘導結合法によって生成されたプラズマ中で高周波を基板1に加えることで、基板1にマイナスのバイアス電圧が発生することによりプラズマ中のプラスイオンである $\text{SF}_5^+$ や $\text{CF}_3^+$ が基板1に向かって衝突するのでドライエッチングは垂直下方方向に進むことになり、ドライエッチングを抑制させる際には基板1に高周波を加えなければ基板1にはバイアス電圧が全く発生しないので、保護膜の材料となる $\text{CF}^+$ が偏向を受けなくなり、基板1のドライエッチング穴の壁面へ均一な保護膜の形成ができることになる。実験ではエッチングを促進するガスとして $\text{SF}_6$ 、抑制するガスとして $\text{C}_4\text{F}_8$ を用いて確認している。

【0075】

これによって、エッチングは垂直下方のみに進行し、レジストマスク13は前述のように最初の形状を保っているため、結果として図17のようにダイアフラム2の厚み方向に対して45°傾いて貫通孔4を形成することができる。

【0076】

また、上記のような構成とすることにより貫通孔4は窪み3内の最深部より上部に形成されることになる。なお、斜めに傾けてエッチングするので貫通孔4の断面形状はレジストマスク13の開口部の形状より少し歪む。これが問題な場合は斜めにしたときに円形状に見えるようにレジストマスク13の形状を変えておく必要がある。これにともない、窪み3のエッチング形状も少し変わるので、これらを総合的に鑑み、レジストマスク13の形状を決定すると良い。

【0077】

なお、基板1を傾ける場合の可能な角度はレジストマスク13の開口部の形状と厚みによって決定されるものであり、例えば1μmの開口部で1μmの厚みを持つレジストマスクの場合はエッチングの幾何的な位置からして45°よりも小さな傾きでなければエッチングはできない。

【0078】

また、基板1を傾けてエッチングを行わない場合には図21のように窪み3の最深部に貫通孔14が形成されることになる。これは被験体細胞8の大きさが窪み3に対して適当であり、最深部まで容易に到達するような場合にはこのような形状でも構わない。

【0079】

なお、レジストマスク13の形状には丸形や楕円形の他に矩形、U字形あるいはこれらを組み合わせた形状も形成することができる。レジストマスク13の形状を矩形とした場合には、エッチングを促進するガスによって、図22のように窪み16の形状がカメラコ状となり、貫通孔15はレジストマスク13と同じ矩形となる。

【0080】

また、レジストマスク13の形状をU字形とした場合には、図23のように窪み18の形状は半球形になり、貫通孔17はレジストマスク13と同じU字形となる。

【0081】

なお、本実施の形態1の別の応用例として上述した同一の窪み3内に複数の貫通孔を形成する場合には、図19のように貫通孔4を形成する工程を角度を変えてエッチングを行うことで達成される。なお、レジストマスク13はエッチング後に除去する。

【0082】

次に、図18に示すように基板1の下面から通常の薄膜形成工程により、金を主体とする検出電極5a、5bをそれぞれの貫通孔4に近接して形成する。基板1の下面には凸凹があるが、このような凸凹のある面でもフォトリソの塗布、露光、パターニングといったことは可能である。しかし、極めて解像度の高いパターンが要求される場合には、基板1にダイアフラム2を形成後、図20に示すように、窪み3を形成する面をダイアフラム2の下面としても構わない。本発明では窪み3のパターンの方が検出電極5a、5bのパターンほど解像度が要求されないため、より簡単な製造工程となる。

【0083】

10

20

30

40

50

なお、窪み 3 内に複数の貫通孔 10a、10b が形成されている場合にも上記と同様に、通常の薄膜形成工程によって、図 11 に示すように検出電極 11a、11b を形成する。この場合は、窪み 3 内に形成された貫通孔が一つの場合より要求されるパターンの解像度が低いので、より簡単な製造工程である。

【0084】

なお、本実施の形態 1 では最初にダイアフラム 2 を形成した後、窪み 3、貫通孔 4 を形成する方法について説明してきたが、この他の方法として最初に、窪み 3、貫通孔 4 を形成した後、基板 1 の下部よりエッチングを行ってダイアフラム 2 を形成する方法によっても同じ構成の細胞外電位測定デバイスを得ることができる。

【0085】

なお、基板 1 としてシリコンを用いたが、シリコンの中に酸化シリコンが埋め込まれた基板を用いることもできる。このような基板は SOI 基板と呼ばれ、上部のダイアフラム 2 の厚みを高精度にしたり、貫通孔 4 をエッチングによって形成する際、酸化シリコン層がエッチングストップ層となるのでより簡単な製造方法とすることができる。

【0086】

【発明の効果】

以上のように本発明の細胞外電位測定デバイスの構成によれば、被験体細胞の細胞膜が隙間無く密着するので、細胞が活動する際に発する物理化学的变化を貫通孔側に設けられた検出電極によって効率よく検出することが可能となり、窪み内の正確な位置に容易に貫通孔を形成できるとともに培養液を一定に保つことにより安定して測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの斜視図

【図 2】同平面図

【図 3】同断面図

【図 4】同貫通孔周辺部の拡大断面図

【図 5】同拡大断面図

【図 6】同動作を説明するための要部拡大断面図

【図 7】同要部拡大断面図

【図 8】同要部拡大断面図

【図 9】同要部拡大断面図

【図 10】本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの断面図

【図 11】同要部拡大図

【図 12】本実施の形態 1 における製造方法を示すための細胞外電位測定デバイスの断面図

【図 13】同断面図

【図 14】同断面図

【図 15】同断面図

【図 16】同断面図

【図 17】同断面図

【図 18】同断面図

【図 19】同断面図

【図 20】同断面図

【図 21】同細胞外電位測定デバイスの一例を示す断面図

【図 22】同斜視図

【図 23】同斜視図

【図 24】従来の細胞外電位測定デバイスの一例を示す断面図

【符号の説明】

1 基板

2 ダイアフラム

10

20

30

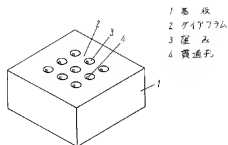
40

50

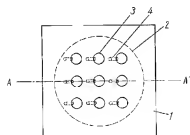
- 3 窪み
- 4 貫通孔
- 5 検出電極
- 5 a、5 b 検出電極
- 6 培養液
- 8 被験体細胞
- 10 a、10 b 貫通孔
- 11 a、11 b 検出電極
- 12 レジストマスク
- 13 レジストマスク
- 14 貫通孔
- 15 貫通孔
- 16 窪み
- 17 貫通孔
- 18 窪み

10

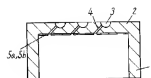
【図 1】



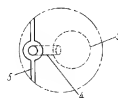
【図 2】



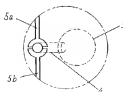
【図 3】



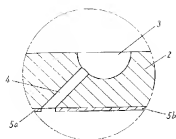
【図 4】



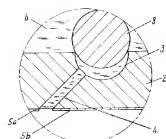
【図 5】



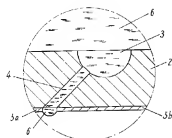
【図 6】



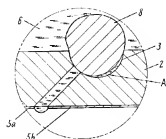
【図 8】



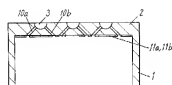
【図 7】



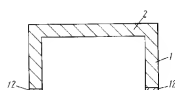
【図 9】



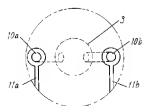
【図 10】



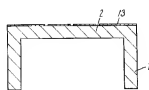
【図 13】



【図 11】



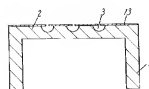
【図 14】



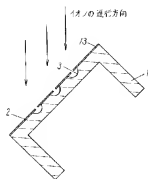
【図 12】



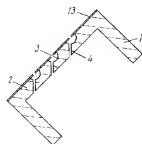
【図 15】



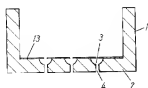
【図 16】



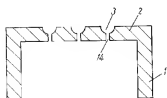
【図 17】



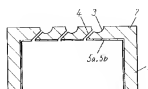
【図 20】



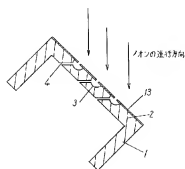
【図 21】



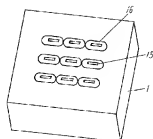
【図 18】



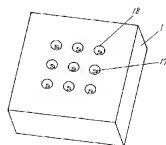
【図 19】



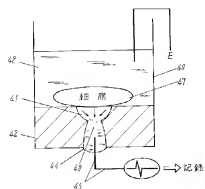
【図 22】



【図 23】



【図 2 4】





---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

デマコード (参考)

G O I N 33/50

Z

(72)発明者 江本 文昭

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電子部品株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 FB05 GC18 JA07